

应用 SET-iFISH 技术检测肾细胞癌外周血循环肿瘤细胞的初步研究

郑国洋¹, 张铭鑫^{1,2}, 张玉石¹, 李汉忠¹, 王站¹, 张索宇¹

¹中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院 泌尿外科, 100730

²青岛大学附属医院 泌尿外科, 266000

通信作者: 张玉石, 电话: 010-69156073, 邮箱: zhangyushi@126.com

摘要:【目的】应用 SET-iFISH 技术对肾细胞癌外周血循环肿瘤细胞及其亚型进行检测以及相关临床分析。【材料与方法】北京协和医院确诊的 55 例肾细胞癌患者, 收集临床资料, 采集外周血 6ml, 应用差减富集法分离富集 CTCs, iFISH 技术进行 CTCs 分析鉴定。【结果】55 例肾癌患者中有 51 例检测到 CTCs, 以 CTCs \geq 3/6ml 为阳性标准, 55 例肾癌 CTCs 检测阳性率为 63.6%, 伴有癌栓或远处转移的肾癌 CTCs 检测阳性率高于局限性肾癌, 但 CTCs 检测值、检测阳性率与其他临床特征之间无明显相关性; 亚型分析显示肾癌 CTCs 以三倍体 CTCs 和 \geq 五倍体 CTCs 为主, 透明细胞癌的 CTM 检出率为 35.1% (13/37), 而 10 例非透明细胞癌均未检测到 CTM。【结论】SET-iFISH 技术对肾癌 CTCs 检出率高, 伴有癌栓或远处转移的肾癌 CTCs 检测阳性率 (\geq 3/6ml) 高于局限性肾癌, 透明细胞癌较其他病理类型可能更容易形成 CTM。

关键词: 肾细胞癌; 循环肿瘤细胞; SET-iFISH

Preliminary study of SET-iFISH technology in detecting circulating tumor cells in renal cell carcinoma

Abstract: **Purpose:** We performed a preliminary study on SET-iFISH technology for detecting circulating tumor cells in renal cell carcinoma. **Material and Methods:** Clinical information and 6ml peripheral blood for SET-iFISH detection of 55 cases diagnosed with renal cell carcinoma in PUMCH. **Results:** CTCs were detected in 51 cases of the 55 renal cell carcinoma patients. Defining the CTCs \geq 3/6ml as detection positive, the positive rate of CTCs detection was 63.6% in total. Positive rate in patients with tumor thrombus or metastasis was higher than that in patients with localized tumors, but CTCs count and positive rate were not significant related with other clinical characteristic. Triploid and \geq pentaploid CTCs were the major types

in renal cell carcinoma. Detection rate of CTM in clear cell carcinoma was 35.1% (13/37), but CTM was not detected in the 10 patients with non-clear cell carcinoma.

Conclusion: Detection rate of CTCs in renal cell carcinoma using SET-iFISH technology was high. Positive rate of CTCs of renal cell carcinoma with thrombus or metastasis was higher than that of localized ones. CTM may be more easily to form in renal clear cell carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma; circulation tumor cells; SET-iFISH

肾细胞癌（Renal cell carcinoma, RCC）简称肾癌，是泌尿系统常见的恶性肿瘤，约占全部成人恶性肿瘤的 2%-3%^[1]；2015 年我国大陆新增肾癌患者约 66800 例，约 23400 例死于肾癌^[2]。30% 的肾癌患者初诊时即伴有远处转移，局限性肾癌手术治疗后仍有 25%-40% 逐渐出现复发或转移^[3]，血行转移是主要途径，转移性肾癌通常预后不佳。

循环肿瘤细胞（Circulating tumor cells, CTCs）是指肿瘤病灶中浸润血管壁进入循环系统的肿瘤细胞^[4]。由于含量极少通常较难检测，近年来随着 CTCs 检测技术的发展，多种恶性肿瘤均有效检测到 CTCs，并在肿瘤的诊断、转移风险和预后监测等方面具有潜在的临床价值。本研究应用差减富集法(Subtraction enrichment technology, SET)联合免疫荧光染色-染色体荧光原位杂交技术(immunofluorescence-fluorescence in situ hybridization, iFISH)的 SET-iFISH 技术检测肾细胞癌患者外周血样本，对肾癌 CTCs 及其临床相关性进行初步研究。

材料与方法

1、研究对象

2017 年 7 月-2018 年 12 月于北京协和医院确诊的 55 例肾细胞癌患者。收集临床资料，采用 ACD 抗凝真空采血管（Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA）抽取 6ml 外周血，充分混匀后 4 °C 保存，48h 内送检。

2、SET 法分离 CTCs

- 1) 磷酸盐缓冲盐水（Phosphate Buffered Saline, PBS）洗涤，裂解红细胞；
- 2) 反应混合物以 300 ×g 离心 5min，底部沉淀细胞加入 PBS，随后加入磁珠偶联的抗白细胞表面标记物 CD45 的单克隆抗体孵育 30min；
- 3) 应用磁场架(Promega, Madison, WI)吸附磁珠，去除白细胞后的溶液以 500×g 离心 3min，底部沉淀细胞进行免疫荧光分析。

3、CTCs 的 iFISH 检测分析

- 1) 应用抗 CD45 的 Alexa Flora 594 单克隆抗体，联合抗肾癌肿瘤标志物（CA9、EpCAM 或 PAX-8）的抗体，避光条件下对细胞进行免疫标记 1h；
- 2) PBS 洗脱三次，用 4'-6 二脒基-2-苯基吲哚(4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)（nvitrogen, Carlsbad, CA）进行细胞核荧光染色；
- 3) 用 8 号染色体丝粒探针（Chromosome centromere probes, CEP）SpectrumOrange（Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA），应用 S500 StatSpinThermoBrite

Slide Hybridization/Denaturation System (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) 进行 FISH 检测。

4、CTCs 鉴定标准

- 1) DAPI 阳性的蓝染细胞核;
 - 2) CD45 不表达;
 - 3) 8 号染色体异倍体伴肿瘤标志物表达阳性或阴性, 或瘤标阳性的二倍体;
- 注:CTCs 应同时满足上述 3 项,循环肿瘤微栓子(Circulating tumor microemboli, CTM) 为多个 CTCs 聚集或与其他细胞形成的细胞团;
- 4) 以 CTCs≥3/6ml 为界值, 用于不同分期和病理类型肾癌的分析。

5、统计学方法

应用 SPSS 软件 (Statistical Product and Service Solutions version 24.0, USA) 进行统计学分析。符合正态分布的计量资料数据用均值±标准差描述; 非正态分布的计量资料数据用中位数(四分位间距)描述, 组间比较采用非参数检验分析; 计数资料以频数、频率描述, 组间比较采用卡方检验或 Fisher’s 精确检验; 连续变量的相关性分析采用 Spearman 等级相关系数的非参数统计方法。检测结果采用双侧检验, 以 P<0.05 作为具有显著统计学差异的检验标准。

结果

1、CTCs 检测结果概述

55 例肾细胞癌患者临床信息见表 1, 20 例局限性肾癌, 35 例伴有癌栓或转移的局部晚期/晚期肾癌 (其中 3 例仅有癌栓形成); 透明细胞癌 35 例, 乳头状细胞癌 I 型 2 例, 乳头状细胞癌 II 型 1 例, 嫌色细胞癌 3 例, Xp11.2 易位型肾细胞癌 4 例, 透明细胞癌伴肉瘤样分化 1 例, 透明细胞癌伴乳头状细胞癌 1 例, 未做免疫组化分型的 8 例。

表 1 55 例肾细胞癌患者临床信息

| 临床特征 | 统计信息 (n=55) |
|-----------|-------------|
| 年龄, 岁 | 54.8±11.3 |
| 性别 | |
| 男性 | 38 (69.1%) |
| 女性 | 17 (30.9%) |
| 肿瘤位置 | |
| 左侧 | 21 (38.2%) |
| 右侧 | 32 (58.2%) |
| 双侧 | 2 (3.6%) |
| 肿瘤最大径, cm | 6.7±3.6 |
| 分期 | |
| I 期 | 14 (25.5%) |
| II 期 | 6 (10.9%) |
| III 期 | 10 (18.2%) |
| IV 期 | 25 (45.5%) |

| | |
|--------|------------|
| 局限性肾癌 | 20 (36.4%) |
| 伴癌栓或转移 | 35 (63.6%) |

病理类型

| | |
|--------|------------|
| 透明细胞癌 | 37 (67.3%) |
| 非透明细胞癌 | 10 (18.2%) |
| 未明确 | 8 (14.5%) |

应用 SET-iFISH 技术进行 CTCs 检测，检测值为每 6ml 血液样本中 CTCs 数量，包括三倍体 CTCs、四倍体 CTCs、 \geq 五倍体 CTCs、CTM 共 4 种亚型。有 4 例患者未检测到 CTCs，其余的 51 例共检测到 581 个 CTCs，包括 117 个三倍体 CTCs，50 个四倍体 CTCs，354 个 \geq 五倍体 CTCs，和 60 个 CTM（部分 CTCs 检测照片见图 1）。CTCs 的检出率为 92.7%(51/55)，CTCs 检测值中位数为 4(2-14)；由于以 CTCs \geq 2/6ml 为标准未得出统计学意义分析结果，因此本研究以 CTCs \geq 3/6ml 作为阳性标准，55 例肾癌患者的 CTCs 检测阳性率为 63.6% (35/55)（表 2）。

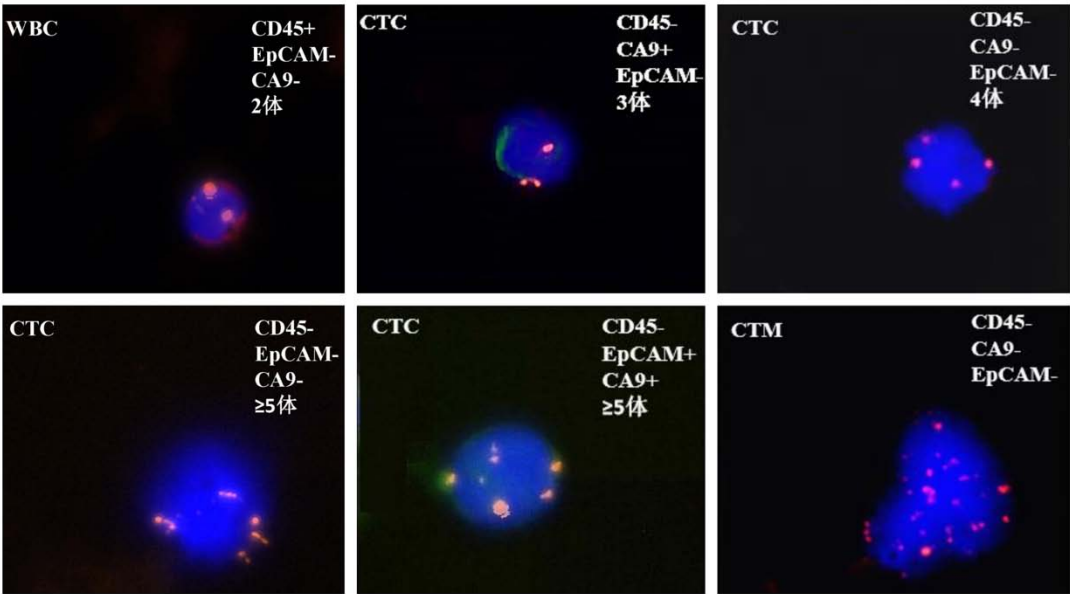


图 1 部分 CTCs 检测照片

2、肾细胞癌 CTCs 检测值及检测阳性率的临床相关分析

55 例肾细胞癌 CTCs 检测值的中位数与患者年龄(P=0.47)、肿瘤最大径之间(P=0.84)，均未发现明确相关性；男女患者间 CTCs 检测阳性率无统计学差异。

20 例局限性肾癌 CTCs 检测值的中位数为 2(2-17)，CTCs 检测阳性率为 45% (9/20)；35 例伴有癌栓或转移的局部晚期/晚期肾癌 CTCs 检测值的中位数为 4 (2-14)，CTCs 检测阳性率为 74.3% (26/35)。伴有癌栓或转移的肾癌 CTCs 检测阳性率高于局限性肾癌，但 CTCs 检测值的中位数无统计学差异（表 2）。

表 2 55 例肾癌 CTCs 检测值及检测阳性率

| 分组,n | CTCs 检测值 | CTCs \geq 3/6ml | CTCs \geq 2/6ml |
|-----------|---------------|-------------------|-------------------|
| 总体,55 | 4(2-14) | 63.6%(35/55) | 80%(44/55) |
| 性别 | | | |
| 男性,38 | 3(2-11.25) | 60.5%(23/38) | 78.9%(30/38) |
| 女性,17 | 7(2-24.5) | 70.6%(12/17) | 82.4%(14/17) |
| | P=0.22 | P=0.47 | P=1.0 |
| 分期 | | | |
| 局限性肾癌,20 | 2(2-17) | 45%(9/20) | 80%(16/20) |
| 伴癌栓或转移,35 | 4(2-14) | 74.3%(26/35) | 80%(28/35) |
| | P=0.38 | P=0.03 | P=1.0 |
| 转移部位 | | | |
| 有癌栓,7 | 7(3-24) | 71.4%(5/7) | 85.7%(6/7) |
| 无癌栓,48 | 3.5(2-13.25) | 62.5%(30/48) | 79.2%(38/48) |
| | 0.38 | P=0.97 | P=1.0 |
| 有淋巴结转移,10 | 8(2.5-16.5) | 80%(8/10) | 70%(7/10) |
| 无淋巴结转移,45 | 3(2-13) | 60%(27/45) | 80%(36/45) |
| | P=0.35 | P=0.41 | P=0.79 |
| 有肺转移,23 | 4(2-15) | 69.6%(16/23) | 78.3%(18/23) |
| 无肺转移,32 | 4(2-11.75) | 59.4%(19/32) | 81.3%(26/32) |
| | P=0.69 | P=0.44 | P=0.79 |
| 有骨转移,12 | 5(1.25-12.75) | 66.7%(8/12) | 75%(9/12) |
| 无骨转移,43 | 4(2-15) | 62.8%(27/43) | 81.4%(35/43) |
| | P=0.94 | P=1.0 | P=0.94 |
| 受累脏器 | | | |
| 单个脏器受累,19 | 4(3-12) | 78.9%(15/19) | 84.2%(16/19) |
| 多个脏器受累,16 | 7(1.25-21.5) | 68.8%(11/16) | 75%(12/16) |
| | P=0.78 | P=0.77 | P=0.80 |
| 病理类型 | | | |
| 透明细胞癌,37 | 3(2-10) | 64.9%(24/37) | 83.8%(31/37) |
| 非透明细胞癌,10 | 4(1.75-24.5) | 50%(5/10) | 70%(7/10) |
| | P=0.95 | P=0.39 | P=0.60 |

35 例局部晚期/晚期肾癌患者中, 伴有癌栓的有 7 例 (梅奥医疗中心分级标准: 0 级 4 例, 1 级 2 例, 2 级 1 例), 转移部位分别为肺 (23 例)、骨 (12 例)、

淋巴结（10 例）、肝（2 例）、肾上腺（1 例），有 11 例伴有两个或两个以上脏器受累（将癌栓也看作一个受累脏器）。受累脏器数量与 CTCs 检测值之间未见明确相关性，单个脏器受累与多个脏器受累的肾癌患者之间，CTCs 检测阳性率无统计学差异。对是否伴癌栓、是否伴肺转移、是否伴骨转移、是否伴淋巴结转移分别进行分析，CTCs 检测阳性率均无统计学差异。

37 例透明细胞癌中有 34 例检测到 CTCs，检测值中位数为 3（2-10），CTCs 检测阳性率为 64.9%（24/37），其中有 1 例透明细胞癌伴乳头状细胞癌 1 型（CTC=30），有 1 例透明细胞癌伴肉瘤样分化（CTC=7）。10 例非透明细胞癌的 CTCs 检测值中位数为 4（1.75-24.5），CTCs 检测阳性率为 50%（5/10）。分析结果显示，透明细胞癌与非透明细胞癌相比，CTCs 检测值和 CTCs 阳性率均无统计学差异（表 2）。

3、肾细胞癌 CTCs 亚型的临床相关分析

亚型分析结果显示，肾癌患者外周血检测到的 CTCs 以≥五倍体 CTCs 和三倍体 CTCs 为主，中位数分别为 2(1-7)和 1(0-3)，两者无统计学差异，但均明显高于四倍体 CTCs 和 CTM（图 2、表 3）。CTCs 各亚型的检出率分别为三倍体（69.1%）、四倍体（43.6%）、≥五倍体（80.0%）、CTM（32.7%），三倍体 CTCs 和≥五倍体 CTCs 的检出率无统计学差异，但均高于四倍体 CTCs 和 CTM(表 4)。

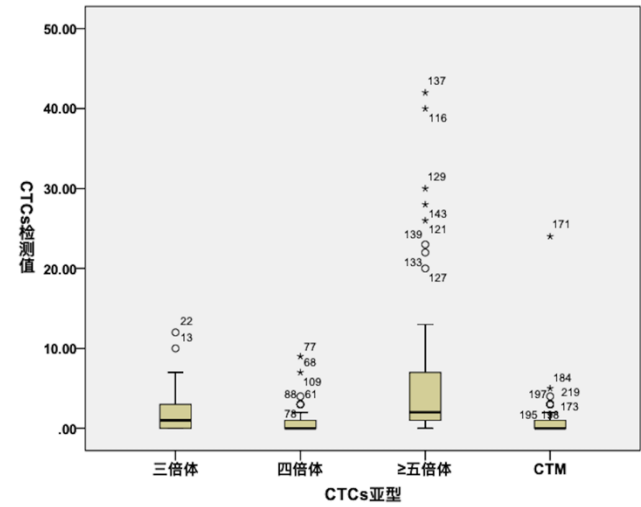


图 2 CTCs 各亚型检测值箱式图

表 3 肾癌 CTCs 亚型检测值相关分析

| 分组 | 三倍体 CTCs | 四倍体 CTCs | ≥五倍体 CTCs | CTM |
|--------|----------|----------|--------------|--------|
| 总体 | 1(0-3) | 0(0-1) | 2(1-7) | 0(0-1) |
| 分期 | | | | |
| 局限性肾癌 | 1(0-2) | 0(0-1) | 1(0.25-7.75) | 0(0-1) |
| 伴癌栓或转移 | 1(0-3) | 0(0-1) | 2(1-7) | 0(0-1) |
| | P=0.51 | P=0.75 | P=0.62 | P=0.87 |

| | | | | |
|--------|-----------|-----------|--------------|--------|
| 病理类型 | | | | |
| 透明细胞癌 | 1(0-2.5) | 0(0-1) | 1(1-7) | 0(0-1) |
| 非透明细胞癌 | 1(0-3.75) | 0(0-0.25) | 1.5(1-22.25) | — |
| | P=0.79 | P=0.24 | P=0.60 | |

伴有癌栓或远处转移的局部晚期/晚期肾癌与局限性肾癌相比，三倍体 CTCs、四倍体 CTCs、≥五倍体 CTCs 以及 CTM 的检出率和中位数均无统计学差异（表 3、表 4）。透明细胞癌或含透明细胞癌成分的混合型肾癌的 CTM 检出率为 35.1%（13/37），而 10 例非透明细胞癌均未检测到 CTM，差异有统计学意义（ $P=0.04$ ）；对于三倍体 CTCs、四倍体 CTCs、≥五倍体 CTCs 的中位数及检出率，透明细胞癌和非透明细胞癌之间均无统计学差异（表 3、表 4）。

表 4 肾癌 CTCs 亚型检出率相关分析

| 分组 | 三倍体 CTCs | 四倍体 CTCs | ≥五倍体 CTCs | CTM |
|--------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 总体 | 69.1%(38/55) | 43.6%(24/55) | 80.0%(44/55) | 32.7%(18/55) |
| 分期 | | | | |
| 局限性肾癌 | 70.0%(14/20) | 40.0%(8/20) | 75.0%(15/20) | 35.0%(7/20) |
| 伴癌栓或转移 | 68.6%(24/35) | 45.7%(16/35) | 82.8%(29/35) | 31.4%(11/35) |
| | P=0.91 | P=0.68 | P=0.48 | P=0.79 |
| 病理类型 | | | | |
| 透明细胞癌 | 67.6%(25/37) | 45.9%(17/37) | 78.4%(29/37) | 35.1%(13/37) |
| 非透明细胞癌 | 50.0%(5/10) | 20.0%(2/10) | 90.0%(9/10) | 0 |
| | P=0.31 | P=0.26 | P=0.71 | P=0.04 |

讨论

循环肿瘤细胞于 1869 年由 TR Ashworth 首次报道并命名^[5]。大部分 CTCs 进入循环系统后即被免疫系统杀死或自行凋亡，仅极少数 CTCs 稳定存在于循环系统，并有可能穿出血管壁参与转移灶的形成^[6]，因此外周血中检出 CTCs 可能提示存在转移风险^[7]。随着 CTCs 检测技术的进展，CTCs 在恶性肿瘤临床诊疗中的应用价值也逐渐被重视。

CTCs 的检测技术及临床应用

由于外周血中 CTCs 含量极低，首先要根据生理特性或物理特征对循环肿瘤细胞进行分离富集^[8]。生理特性富集法的原理是抗体与细胞表面抗原的特异性结合，如 CellSearch 系统可通过与肿瘤细胞表面的上皮细胞黏附分子（EpCAM）、细胞角蛋白（CK）等特异性结合，直接对 CTCs 进行富集；也可通过与白细胞表面分子标志物结合将其去除，从而对 CTCs 进行富集^[9]。物理特性富集法是根据 CTCs 的直径、密度、沉降系数、表面电荷等物理学特性，采用密度梯度离心

法、膜过滤法等对 CTCs 进行分离富集^[10]。随后对分离富集的细胞进行分析, 鉴定出肿瘤标志物表达阳性或染色体倍数异常的 CTCs^[11]。

本研究中 CTCs 检测应用的美国 Cytelligen 公司的 SET-iFISH 技术, 将差减富集技术和 iFISH 技术整合为一个检测体系。通过差减富集技术与白细胞表面 CD45 分子结合后将其去除从而对 CTCs 进行分离富集。CTCs 分析鉴定则应用免疫荧光染色与 8 号染色体荧光原位杂交技术相结合的方法, 由于肿瘤细胞内并非所有染色体数目都会出现异常^[12], 肿瘤标志物也存在表达差异, 因此该技术能同时对 CTCs 进行肾癌标志物染色和染色体 iFISH 双重鉴定, 与单纯依赖 EpCAM 和 CK+ 等细胞表面分子的检测方法相比, 能更有效的鉴别 CTCs, 并可进行 CTCs 亚型的相关瘤标和核型分析^[13]。

应用 SET-iFISH 技术能在多种恶性肿瘤有效检出 CTCs。Chen 等于 2013 年应用 SET-iFISH 技术在 42 例肺癌患者中的 20 例中检出 CTCs, 而 10 例良性肺病患者均未检测到 CTCs, 特异性较高; 并且肺癌分期越晚, CTCs 检出率越高 (I 期 20%、II 期 45.5%、III 期 54.5% 和 IV 期 70%)^[14]。2014 年 Li 等应用 SET-iFISH 技术和 CellSearch 技术分别对进展期胃癌患者进行 CTCs 检测^[15], 结果显示 SET-iFISH 的 CTCs 检测阳性率为 90.5%, 明显高于 CellSearch 的 54.8%。Gao 等应用 SET-iFISH 技术对 25 例胰腺癌患者进行 CTCs 检测^[16], 以 CTCs 计数 $\geq 2/7.5\text{ml}$ 作为标准, 敏感性和特异性分别为 88% 和 90%; 并且发现 CTCs 计数 $< 3/7.5\text{ml}$ 的胰腺癌患者的总体生存时间优于 CTCs 计数 $\geq 3/7.5\text{ml}$ 的胰腺癌患者 (15.2 个月 vs 10.2 个月); Ge 等应用 SET-iFISH 技术对食管癌和肺癌患者进行 CTCs 检测^[13], 阳性率分别高达 87% 和 92%, 并且在 EpCAM 等瘤标低表达或不表达的恶性肿瘤中, CellSearch 技术的 CTCs 检测阳性率较低, SET-iFISH 技术仍能保持 70% 左右的 CTCs 检测阳性率。上述研究显示了 SET-iFISH 技术用于 CTCs 检测的优势, 与 CellSearch 等传统技术相比敏感性和特异性更高, 而且与肿瘤的分期、预后等临床特征可能具有一定的相关性。

肾细胞癌 CTCs 的检测及其临床应用

肾细胞癌相关的 CTCs 研究相对较少, CellSearch 系统的早期研究提示肾癌 CTCs 检出率较低^[17]。Gradilone 等应用 CellSearch 系统对 25 例转移性肾癌患者进行 CTCs 检测, 只有 16% 的患者明确检出 CTCs, 60% 的患者仅检测到疑似 CTCs 的可疑细胞^[18]。北京协和医院张玉石教授等于 2013 年应用 CellSearch 技术对 8 例中晚期肾细胞癌患者进行外周血 CTCs 检测, 其中 6 例患者有明确的转移灶, 但 8 例患者 CTCs 检测结果均为阴性^[19]。上述研究中 CellSearch 技术检测 CTCs 主要依赖 EpCAM、CK8/18/19 等标志物, 但肾癌组织细胞的 EpCAM 表达有限^[20], 而且在上皮间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 过程中 CTCs 可能会丢失 EpCAM、CKs 等上皮细胞标志物^[21], 这可能是导致 CellSearch 对肾癌 CTCs 检出率较低的原因。Gilbert 等应用 RT-PCR 技术对肾癌患者进行 CTCs 检测, 发现外周血中检测到 CA9 的患者的肿瘤复发率更高^[22], 但由于核酸检测技术的限制, 该 CTCs 检测技术尚未在临床上得到充分验证。

SET-iFISH 技术能更有效地检出 CTCs, 但目前尚缺乏肾癌 CTCs 的相关研究, 作者单位既往的初步研究应用 SET-iFISH 技术检测了 9 例肾细胞癌患者, 其中有 6 例 CTCs 检测阳性, 初步显示了该技术用于肾癌 CTCs 检测的有效性。本研究应用 SET-iFISH 技术对 55 例肾细胞癌患者进行 CTCs 检测, 其中 51 例成功检出 CTCs, 检出率高达 92.7%; 以 CTCs 计数 $\geq 3/6\text{ml}$ 作为检测阳性标准, 55 例肾癌的 CTCs 检测阳性率高达 63.6%。本研究中肾癌 CTCs 的检出率和阳性率均

较高,原因可能是该技术同时对 CTCs 进行瘤标染色和染色体 iFISH 的双重鉴定,不单纯依赖细胞表面标志物,因此 SET-iFISH 与 CellSearch 等传统技术相比能更有效的检测肾癌 CTCs,更具临床应用价值。

目前尚缺乏用于分析不同分期肾癌 CTCs 的临界参考值的统一标准,结合本研究数据,我们以 CTCs 计数 $\geq 3/6\text{ml}$ 作为应用 SET-iFISH 技术检测肾癌 CTCs 的阳性标准,用于不同分期肾癌的 CTCs 相关分析,结果显示伴有癌栓或远处转移的肾癌 CTCs 阳性率明显高于局限性肾癌,提示 CTCs 检测阳性也许能预测癌栓形成或远处转移的风险。虽然在指南中并未作为肾癌随访中的常规检查,PET-CT 确实能发现体积较小的远处转移灶,但此时已经有转移灶形成,而 CTCs 检测阳性也许可以在远处转移灶形成之前提示转移风险的存在,这也是 CTCs 研究的临床意义之一。但另一方面,本研究中 CTCs 检测值以及检测阳性率,与受累脏器数量、转移部位、病理类型、肿瘤大小等临床特征之间,均未发现有统计学意义的相关性,因此 SET-iFISH 对肾癌 CTCs 的检出率虽高,但在肾癌临床特征相关的应用价值可能存在局限性,有待进一步探讨。另外需客观认识到,在部分局限性肾癌的血液样本中也能检测到 CTCs,而并未出现复发转移,因此 CTCs 检测阳性并不能提示一定会发生转移,CTCs 对肾癌转移风险的预测价值、与靶向药物敏感性之间是否存在相关性、局限性肾癌 CTCs 检测阳性的临床意义以及对术后辅助治疗方案的影响等多个方面,仍有待进一步深入探讨。

本研究还根据 8 号染色体核型分析结果对肾癌 CTCs 进行亚型分析,本组数据中肾癌 CTCs 以 ≥ 5 倍体和三倍体 CTCs 为主,该两种亚型的占比明显高于四倍体 CTCs 和 CTM。值得一提的是,本研究还发现在 37 例透明细胞癌中有 13 例能检出 CTM,而在 10 例非透明细胞癌中均未检出 CTM,这提示与其他病理类型相比,透明细胞癌可能更容易形成循环肿瘤细胞团,但由于样本量限制,仍需进一步研究证实。遗憾的是,本研究中肾癌 CTCs 其他亚型与肿瘤分期、病理类型等临床特征之间未发现明显相关性,也限制了 CTCs 亚型的临床应用价值。

结论

SET-iFISH 技术能有效检测肾细胞癌 CTCs,本研究中检出率高达 92.7%,以 CTCs 计数 $\geq 3/6\text{ml}$ 作为阳性标准,肾癌 CTCs 检测阳性率为 63.6%,体现了 SET-iFISH 技术的优势。临床特征相关性分析发现,伴有癌栓或远处转移的肾癌 CTCs 阳性率明显高于局限性肾癌。CTCs 亚型分析提示透明细胞癌较其他病理类型可能更容易形成循环肿瘤微栓子。但 CTCs 与其他肾癌临床特征之间未发现明确相关性,其临床应用价值存在限制性。

本文不存在任何自利益冲突。

致谢: 本研究由辉瑞投资有限公司医学部资助。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin. 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin. 2016, 66(2): 115-132.

- [3] Capitanio U, Bensalah K, Bex A, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol*. 2019, 75(1): 74-84.
- [4] Mego M. Emerging role of circulating tumor cells in cancer management[J]. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2014, 35(4): 237-238.
- [5] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(8): 4589-4594.
- [6] 乔雪峰, 张玉娟, 崔巍. 循环肿瘤细胞致肿瘤血行转移研究进展[J]. *协和医学杂志*. 2014, 3: 331-334.
- [7] Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells[J]. *EMBO Mol Med*. 2015, 7(1): 1-11.
- [8] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. *Nat Rev Cancer*. 2014, 14(9): 623-631.
- [9] Yu M, Stott S, Toner M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization[J]. *J Cell Biol*. 2011, 192(3): 373-382.
- [10] Zabaglo L, Ormerod MG, Parton M, et al. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells[J]. *Cytometry A*. 2003, 55(2): 102-108.
- [11] Jaeger BA, Jueckstock J, Andergassen U, et al. Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer[J]. *Biomed Res Int*. 2014, 2014: 491459.
- [12] Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, et al. Detection of EpCAM-negative and Cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood[J]. *J Oncol*. 2011, 2011: 252361.
- [13] Ge F, Zhang H, Wang DD, et al. Enhanced detection and comprehensive in situ phenotypic characterization of circulating and disseminated heteroploid epithelial and glioma tumor cells[J]. *Oncotarget*. 2015, 6(29): 27049-27064.
- [14] Chen Q, Ge F, Cui W, et al. Lung cancer circulating tumor cells isolated by the EpCAM-independent enrichment strategy correlate with Cytokeratin 19-derived CYFRA21-1 and pathological staging[J]. *Clin Chim Acta*. 2013, 419: 57-61.
- [15] Li Y, Zhang X, Ge S, et al. Clinical significance of phenotyping and karyotyping of circulating tumor cells in patients with advanced gastric cancer[J]. *Oncotarget*. 2014, 5(16): 6594-6602.
- [16] Gao Y, Zhu Y, Zhang Z, et al. Clinical significance of pancreatic circulating tumor cells using combined negative enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization[J]. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016, 35: 66.
- [17] Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases[J]. *Clin Cancer Res*. 2004, 10(20): 6897-6904.
- [18] Gradilone A, Iacovelli R, Cortesi E, et al. Circulating tumor cells and "suspicious objects" evaluated through CellSearch® in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*. 2011, 31(12): 4219-4221.
- [19] 张玉石, 李汉忠, 周春. 肾细胞癌外周血循环肿瘤细胞检测方法的初步探讨[J]. *中华泌尿外科杂志*. 2013, 34(10): 738-741.
- [20] Zimpfer A, Maruschke M, Rehn S, et al. Prognostic and diagnostic implications

of epithelial cell adhesion/activating molecule (EpCAM) expression in renal tumours: a retrospective clinicopathological study of 948 cases using tissue microarrays[J]. BJU Int. 2014, 114(2): 296-302.

[21] Liu H, Zhang X, Li J, et al. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol. 2015, 141(2): 189-201.

[22] Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, et al. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors[J]. Urology. 2006, 67(5): 942-945.